

Enzimaska sinteza biodizela iz otpadnog ulja iz procesa rafinacije

Nikolić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:795158>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Dora Nikolić

**ENZIMSKA SINTEZA BIODIZELA IZ OTPADNOG ULJA IZ PROCESA
RAFINACIJE**

Diplomski rad

Osijek, rujan 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Energija i okoliš

Tema rada je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 21.9.2020.

Mentor: prof. dr. sc. Sandra Budžaki

ENZIMSKA SINTEZA BIODIZELA IZ OTPADNOG ULJA IZ PROCESA RAFINACIJE

Dora Nikolić, 0113141996

Sažetak: Jedan od razloga nekonkurentnosti biodizela fosilnom dizelskom gorivu je njegova cijena. Obzirom da ukupnu cijenu biodizela, oko 75% čini cijena sirovine te kako bi se povećala cjenovna konkurentnost biodizela na tržištu pribjegava se jeftinijoj sirovini. Potencijalna jeftinija sirovina za proizvodnju biodizela je i otpadno ulje iz procesa rafinacije koje nastaje kao nusprodukt u proizvodnji biljnog ulja. Zadatak ovog rada bio je provesti enzimsku sintezu biodizela pomoću lipaze porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus* različitim kombinacijom biokemijskih reakcija koje kataliziraju lipaze (hidroliza, esterifikacija i transesterifikacija) iz otpadnog ulja iz procesa rafinacije. Na temelju udjela metilnih estera masnih kiselina u sirovom biodizelu, koji su određeni plinskom kromatografijom, procijenjena je primjerenost sirovine kao i optimalna kombinacija biokemijskih reakcija za enzimsku sintezu biodizela iz otpadnog ulja iz procesa rafinacije. Rezultati su pokazali da je dodatak pufera neophodan za provedbu reakcije i da kombinacija esterifikacije i transesterifikacije bez hidrolize rezultira većim udjelom metilnih estera masnih kiselina.

Ključne riječi: biodizel, otpadno ulje, lipaza, esterifikacija, transesterifikacija

Rad sadrži: 46 stranica
27 slika
1 tablica
36 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|-------------------------------------|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Ivica Strelec | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. Sandra Budžaki | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. Tihomir Moslavac | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. Ivana Flanjak | zamjena člana |

Datum obrane: 27. rujna 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Sub department of Energy, Environment and Sustainable Development
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program **Process engineering**
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Energy and environment
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X held on September 21st, 2020.
Mentor: *Sandra Budžaki*, PhD, full prof.

Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Soapstock Oil

Dora Nikolić, 0113141996

Summary: One of the main reasons for low biodiesel demand is its price compared to fossil fuel price. Raw material used in the process makes up for 75% of the total price, which is why cheaper materials are being researched. Great potential is found in waste oils from refinery processes as a major by-product. The goal of this work was to carry out enzymatic synthesis of biodiesel with lipase from *Thermomyces lanuginosus* through different reaction paths (hydrolysis, esterification and transesterification) catalyzed by lipase enzymes and using waste oil from seed refinery process as material. Most favourable reaction conditions were assessed based on the amount of methyl ester fatty acids, determined by gas chromatography. It was found that the reaction rate greatly depends on buffer presence and its concentration and that esterification and transesterification without hydrolysis are more favourable to free fatty acids conversion to methyl ester fatty acids.

Key words: biodiesel, waste oil, lipase, esterification, transesterification

Thesis contains: 46 pages
 27 figures
 1 table
 36 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, full prof. | member |
| 4. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defence date: September 27, 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovaj rad posvećen je mojim roditeljima. Teško je pokazati zahvalnost za ovih 25. godina, no trudit ću se i dalje. Hvala Vam na svakom danu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, Sandri Budžaki, jednoj divnoj i inteligentnoj ženi, bez koje ovaj rad ne bi bio moguć. Cijenim svaki trud i odvojeno vrijeme za realizaciju rada.

Veliko hvala mentorici iz Portugala, profesorici Joani Maia Dias i asistentici Mariani Cruz koje su gostovanje u njihovom laboratoriju učinile prekrasnim i poučnim iskustvom.

Hvala sestri i ostatku moje obitelji, svim mojim prijateljima, starim, novim i onima koji su opet ušli u moj život, učinili ste ovaj period puno veselijim.

Naposljetku, riječima se ne može prenijeti koliko sam zahvalna Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek i svim njegovim radnicima, izgradili ste me kao osobu i zauvijek ću imati samo riječi hvale za Vas!

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj „IP-2020-02-6878.“

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	3
2.1. Biodizel	4
2.2. Sinteza biodizela.....	6
2.2.1. Kemijska sinteza biodizela	9
2.2.2. Enzimaska sinteza biodizela	10
2.3. Sirovine za sintezu biodizela.....	14
3. Eksperimentalni dio.....	16
3.1. Zadatak	17
3.2. Materijali	17
3.2.1. Sirovina	17
3.2.2. Katalizator.....	17
3.2.3. Kemikalije	20
3.3. Metode.....	20
3.3.1. Sinteza biodizela	20
3.3.2. Određivanje slobodnih masnih kiselina	25
3.3.3. Određivanje mono-, di- i triglicerida	25
3.3.4. Određivanje metilnih estera masnih kiselina	26
4. Rezultati i rasprava	27
4.1. Udio slobodnih masnih kiselina.....	26
4.2. Udio mono-, di- i triglicerida	32
4.3. Udio metilnih estera masnih kiselina	35
5. Zaključci	38
6. Literatura	40

1.UVOD

Obzirom na eksplozivni rast populacije na Zemlji, iskorištavanje njezinih prirodnih resursa i sve veću zagađenost okoliša, industrija se okreće uporabi nekonvencionalnih goriva. Sve veća potražnja za gorivom rezultirala je većom cijenom istih pa se fosilna goriva zamjenjuju električnom energijom, vodikom i biogorivom, u svrhu smanjenja emisije štetnih plinova i približavanju održivom načinu razvoja. Održivi razvoj odnosi se na razvitak svih područja društvene zajednice bez ostavljanja negativnih posljedica na buduće naraštaje. Pojam je spomenut prvi put 1969. godine u Washingtonu na Konferenciji o okolišu, a definiran 1987. u izvješću „Naša zajednička budućnost“ Komisije za okoliš i razvoj UN-a kao: „razvitak koji zadovoljava potrebe i aspiracije sadašnjosti bez ugrožavanja mogućnosti i potreba budućih generacija“ (Udovičić, 2004). Implementacija održivog razvoja u sve aspekte društva, zahtjeva potpunu reformu, a najveći fokus je trenutno na razvoju biogoriva. Kao zamjena za fosilno gorivo, biogoriva su najjednostavniji izbor zbog lakog unošenja u već postojeću infrastrukturu.

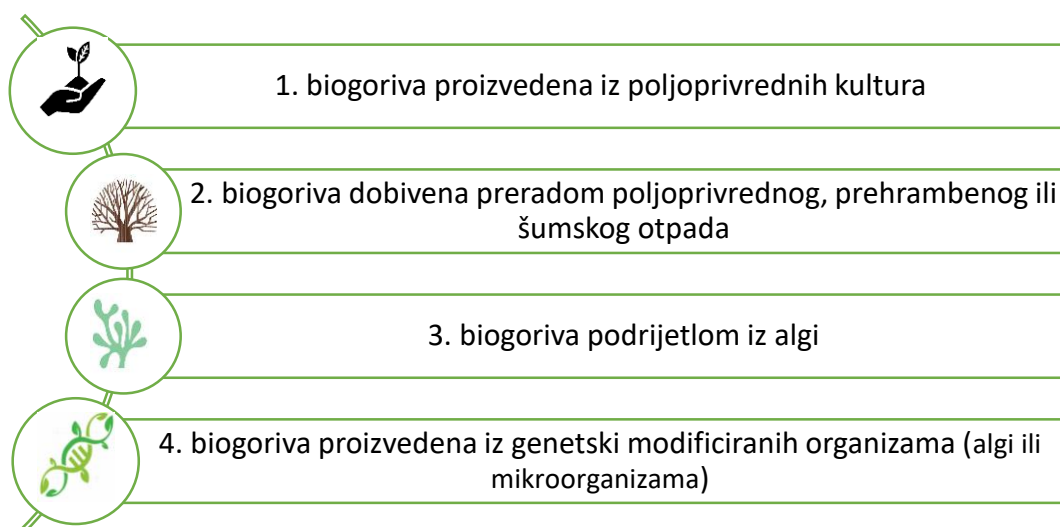
Biodizel se može sintetizirati iz jestivih, nejestivih i/ili otpadnih ulja prehrambene industrije, još uvijek najčešće kemijskim putem zbog niske cijene i iskorištenja katalizatora te poznatog reakcijskog mehanizma, dok se za enzimski katalizirane reakcije, koriste komercijalni enzimi čija je cijena puno veća, ali je proces energetski manje zahtjevan i ne stvara velike količine otpadnih voda. Komercijalizacija biodizela još uvijek nije postignuta u dovoljnoj mjeri, a razlog tome je visoka cijena proizvoda u odnosu na cijenu konvencionalnog goriva, kao posljedica previsoke cijene sirovine i/ili katalizatora korištenog u procesu te ograničenja trenutno dostupnih tehnologija kojom se provodi sinteza.

U ovom radu provedena je enzimaska sinteza biodizela iz otpadnog ulja iz procesa rafinacije jestivog biljnog ulja tzv. *soapstock*, pomoću komercijalne lipaze. Svrha eksperimenta bila je odrediti optimalne uvjete dobivanja većeg udjela metilnih estera masnih kiselina kombinacijom različitih kemijskih reakcija. Eksperimentalni dio rada odrađen je u Laboratoriju za procesno inženjerstvo, okoliš, biotehnologiju i energiju (Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy) na Katedri za kemijsko inženjerstvo na Fakultetu inženjerstva u Portu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIODIZEL

Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (FAME) koji se proizvodi od biljnog ulja i/ili životinjske masti, a koji ima svojstva fosilnog dizela te se može koristiti kao biogorivo (Uredba o kakvoći biogoriva, NN 141/2005). Svojstva biogoriva i goriva dobivena preradom nafte vrlo su slična te se postojeća infrastruktura (rafinerije) koristi za skladištenje i distribuciju biogoriva. Stavljanje biodizela u promet (na tržište) propisano je i definirano standardom o biodizelu te ne iziskuje modifikacije motora (označava se Bxx, gdje xx označava postotak biodizela u smjesi), osim kada se koristi apsolutno čisti biodizel (označen kao B100 na tržištu RH). Norma kojom su propisana svojstva biodizela je europska norma EN14214, koju je ulaskom u EU preuzela i Hrvatska (HRN:EN 14214), a prema kojoj je specificirano minimalno 96,5 % FAME-a u smjesi sirovog biodizela pri čemu sirovi biodizel podrazumijeva produkt reakcije transesterifikacije triglicerida i metilnog alkohola uz odgovarajući katalizator.



Slika 1 Četiri kategorije biogoriva

Biogoriva se dijele u četiri kategorije ili tzv. generacije kao što je prikazano na **Slici 1**. Prva se generacija biogoriva proizvodi iz ulja poljoprivrednih kultura koje se upotrebljavaju i za proizvodnju hrane za ljude i životinje (žitarice, šećerna trska, šećerna repa i uljarice). Napredna biogoriva (druga ili treća generacija), proizvode se iz otpada ili ostataka poljoprivredne, prehrambene ili šumske industrije, a takve se sirovine ne natječu s kulturama za proizvodnju

hrane. Biogoriva četvrte generacije rezultat su djelovanja kombinacije genetski modificiranih biljaka i mikroorganizama, najčešće cijanobakterija (Dahman i sur., 2019). Korištenje biogoriva rezultira smanjenjem emisija stakleničkih plinova za 50 % u odnosu na fosilna goriva, a za realizaciju održivosti bitno je i da sirovine potrebne za njegovu proizvodnju ne budu uzgojene na tlima bogatim ugljikom (šume, močvare) niti na tlima visoke bioraznolikosti (livade).

Povijest biodizela povezuje se sa patentom dizelskog motora Rudolpha Diesela iz 1893. Njegov motor mogle su pogoniti različite vrste biljnih ulja, a 1900. na svjetskoj izložbi u Parizu predstavljen je motor na ulje od kikirikija (od strane francuske tvrtke, a ne Diesela kako se često krivo navodi) (Knothe i sur., 2005). Postupak transesterifikacije patentirao je G. Chavane 1937., odnosno konverziju biljnih ulja u alkilne estere i njihovo korištenje u dizelskim motorima. U Brazilu, 1980. Expedito Parente, prijavljuje prvi patent za industrijsku proizvodnju biodizela i to etilnog estera masnih kiselina (Parente, 1983).

Današnji biodizel ima svojstva gotovo jednaka kao fosilni dizel, a navode se i sljedeće prednosti:

1. Biodizel je biorazgradiv i bolje se razgrađuje od ulja iz kojih je sintetiziran.
2. Smjesa dizela i biodizela povećava mazivost i smanjuje trošenje motora.
3. Biodizel ne stvara velike logističke probleme jer nije zapaljiv (veća točka paljenja od dizela) i u slučaju ispuštanja nije opasan, odnosno ne prouzrokuje veliko zagađenje vode i zraka za razliku od fosilnog dizela.
4. Korištenje smjesa biodizela i dizela rezultira znatno manjim količinama neizgorenih ugljikovodika, CO i sitnih čestica.
5. Povećanjem proizvodnje biodizela, poticala bi se i proizvodnja poljoprivrednih kultura, čime bi se utjecalo na gospodarstvo.

Naravno, biodizel ima nekoliko nedostataka:

1. Biodizel ima manji sadržaj energije od fosilnog dizela, odnosno za jednak obujam injektiranog fosilnog goriva snaga stroja uz biodizel trebala bi biti manja za 8,7 % (Sinčić, 2008).

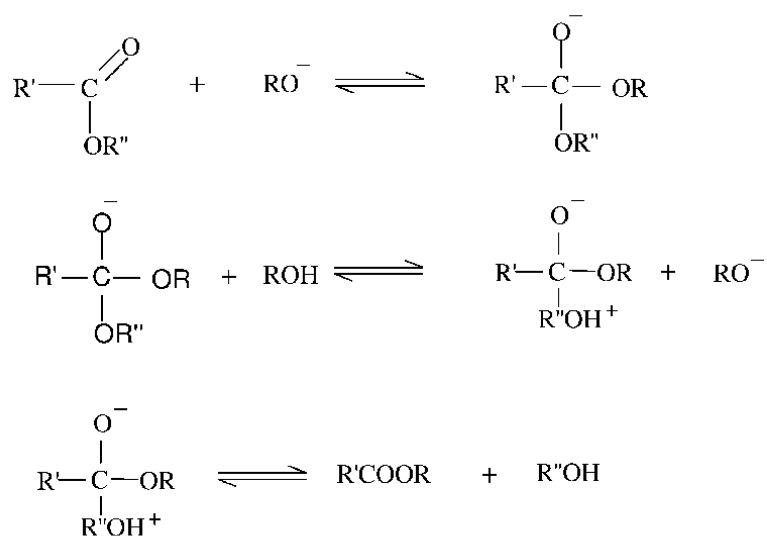
2. Sagorijevanjem biodizela emitira se manja količina štetnih plinova dok se u ispušnim plinovima, u odnosu na fosilno gorivo, spojevi dušikovog oksida pojavljuju u većoj koncentraciji.
3. Poticanje veće proizvodnje poljoprivrednih kultura zahtjeva oprez kako se ne bi površine namijenjene proizvodnji hrane koristile za uzgoj biljaka za sintezu biogoriva, odnosno kako se ne bi dogodilo isto što i u Južnoj Americi kada se cijena hrane i više nego udvostručila, a šume i očuvani parkovi pretvorili u nasade (Kondić i sur., 2015).
4. Temperatura točke tečenja biodizela je veća u odnosu na fosilni dizel što tijekom hladnijih mjeseci iziskuje dodavanje aditiva ili proizvodnju iz ulja koje ne sadrži zasićene masne kiseline. Također, biodizel može uzrokovati začepljenja filtera zbog kristalizacije estera masnih kiselina.
5. Neusklađenost proizvodnje biljnih ulja i biogoriva. Iako je sirovina jeftina, nema je dovoljno za masovnu održivu proizvodnju biodizela.

2.2. SINTEZA BIODIZELA

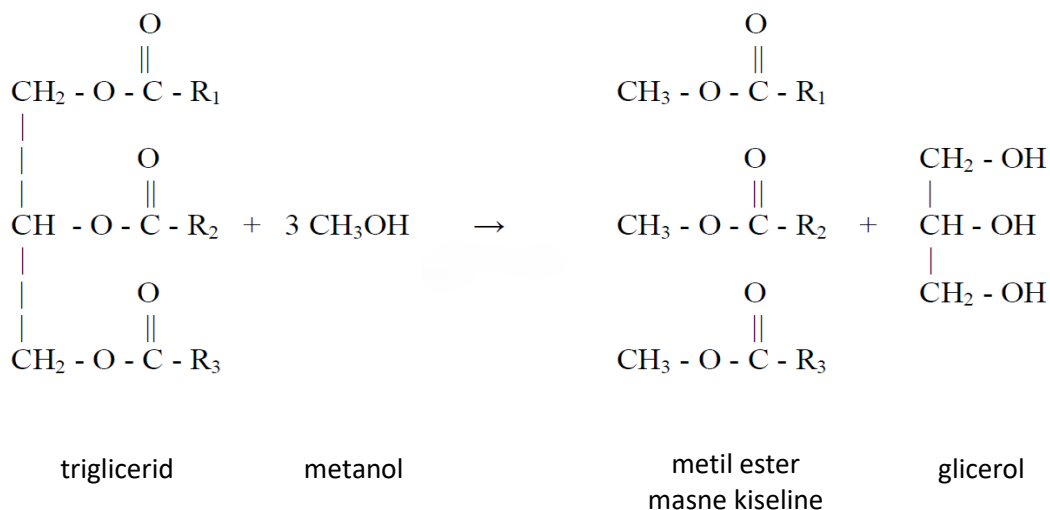
Biodizel nastaje u reakciji transesterifikacije (preesterifikacije), sa ili bez katalizatora. Ponekad se provodi predesterifikacija, prethodna esterifikacija kako bi se uklonile slobodne masne kiseline iz sirovine. Nekatalitički postupci transesterifikacije odvijaju se bez katalizatora (metanol se ponaša kao reaktant i katalizator), ali uz visoku temperaturu i tlak pa je brzina reakcije mala, a utrošak energije velik uz dobiveni biodizel izrazito visoke kvalitete. Naravno, velik utrošak energije rezultira visokim pogonskim troškovima pa takav postupak nije ekonomski isplativ (Pinnarat i Savage, 2008). Stoga se današnja proizvodnja zasniva na katalitičkom postupku. Općenito, transesterifikacija je reverzibilan proces u kojem reagiraju trigliceridi s nižim alkoholima (najčešće metanol) te može biti katalizirana kemijskim (kiselim ili baznim) homogenim ili heterogenim katalizatorima ili biokatalizatorima (lipazom).

Pri miješanju reakcijske smjese postiže se disperzija metanola u uljnoj fazi obzirom da se te dvije faze ne miješaju. Ako je sinteza katalizirana uz kemijski katalizator (NaOH ili H₂SO₄), u kapljicama metanola prisutan je katalizator, što znači da molekule ulja moraju prvo doći u dodir s metanolom i tek onda nastupa reakcija (Sinčić, 2014). Brzina reakcije ovisi o veličini kapljica disperzne faze, točnije o međufaznoj površini i otporu prijenosa tvari. Što su kapljice metanola s katalizatorom sitnije to je i površina reakcije veća te je i brzina reakcije veća. Kako se reakcija odvija i nastaje glicerol, katalizator prelazi u tzv. glicerinsku fazu jer se u njoj bolje topi i reakcija se usporava. Dakle, na brzinu kemijske reakcije utječu tip, veličina i brzina miješanja (Noureddini i Zhou, 1997).

Mehanizam prikazan na **Slici 2** se odvija u tri stupnja: u prvom stupnju iz triglicerida nastaju digliceridi, u drugom monogliceridi, a u trećem (m)etil esteri masnih kiselina i glicerol kao nusprodukt. Pojednostavljeni oblik reakcije prikazan je na **Slici 3**. Izdvojeni glicerol može se dalje plasirati na tržište ovisno o stupnju čistoće.



Slika 2 Mehanizam katalitičke reakcije transesterifikacije između triglicerida i alkohola



Slika 3 Pojednostavljeni prikaz transesterifikacije

S obzirom na reverzibilnost reakcije potrebno je osigurati suvišak alkohola, koji će ravnotežu pomaknuti u desno, u smjeru nastajanja produkata. Stehiometrijski omjer triglicerida i alkohola je 3:1, ali se u industrijskoj praksi koriste puno veći omjeri, čak do 245:1 (Budžaki i Miljić, 2017). Molekulska masa nastalih estera manja je od molekulske mase triglicerida što za posljedicu ima manju viskoznost biodizela u odnosu na polaznu sirovinu. Sirovi biodizel se mora pročititi kako bi zadovoljio propisane uvjete standardom, odnosno moraju se ukloniti preostali mono-, di- i trigliceridi, slobodne masne kiseline (SMK), sapuni, metanol i katalizator. Prilikom mokrog pročišćavanja koriste se velike količine vode (destilirane ili zakiseljene), a takve otpadne vode nužno je obraditi prije ispuštanja u okoliš, što dodatno poskupljuje proces proizvodnje biodizela. Moguće je suho pročišćavanje primjenom membrana: ultrafiltracija i mikrofiltracija (Atadashi, 2015; Ostojčić i sur., 2020). Opća shema proizvodnje biodizela prikazana je na **Slici 4**, gdje je vidljivo da u proces ulazi početna sirovina, koja zbog sadržaja nepoželjnih komponenti mora proći predtretman u kojem se one uklanjaju, a zatim se dodaje alkohol i katalizator te započinje transesterifikacija. Željeni produkt, metilni esteri masnih kiselina, odvajaju se od glicerola, odnosno biodizel koji se mora pročititi od preostalih komponenti (npr. katalizatora ili fosfolipida).



Slika 4 Opći prikaz procesa sinteze biodizela

Svojstva biodizela kao npr. veći sadržaj kisika, veći cetanski broj, itd. doprinose boljem izgaranju u motoru, poboljšavaju mazivost i produljuju životni vijek motora (Stojanović i sur., 2005).

Temperatura izgaranja biodizela je iznad 100 °C, duplo veća od fosilnog dizela, što biodizel čini sigurnijim za skladištenje i distribuciju, dok točka tečenja (eng. *pour point*) stvara probleme u hladnijim geografskim područjima što je već prethodno spomenuto (Sinčić, 2013).

2.2.1. Kemijska sinteza biodizela

Kemijska sinteza biodizela zahtjeva korištenje kiselih ili baznih katalizatora. Najviše se koristi natrijev ili kalijev hidroksid zbog cijene i lake nabave, no visok udio slobodnih masnih kiselina u sirovini smanjuje stupanj konverzije kemijski katalizirane reakcije. Osim toga, visok udio nesaponificirajućih tvari u početnoj sirovini smanjuje udio estera. Dakle, kemijski katalizirana transesterifikacija uvelike ovisi o kvaliteti početne sirovine pa u konačnici i dobiveni produkt, biodizel.

Katalizator se priprema tako da se otapa u metanolu pri čemu nastaje natrijev ili kalijev metoksid, koji se onda dodaje u ulje pri čemu je potrebno osigurati dobro miješanje, ali i dovod topline za optimalan rad katalizatora. Na kraju reakcije, razdvaja se biodizel od glicerola i uklanja višak metanola. Prvu fazu pročišćavanja produkta (biodizela) predstavlja razdvajanje taloženjem u gravitacijskom odjeljivaču pri čemu se razlikuju gornja (biodizelska faza: metilni esteri masnih kiselina i neizreagirani trigliceridi i slobodne masne kiseline) i donja faza (glicerinska faza: glicerol, metanol i katalizator). Nadalje, biodizel se pročišćava višestrukim pranjem sa čistom vodom i kiselinom radi uklanjanja zaostalog metanola i katalizatora koji se nisu izdvojili u glicerinskom sloju. Glicerinski dio sadrži katalizator koji se neutralizira s kiselinom (Knothe, 2005). Proizvodnja biodizela uz bazni katalizator zahtjeva rafinirano biljno ulje sa manjim udjelom slobodnih masnih kiselina (0,1 – 0,5 %) i vode, kako bi se spriječio nastanak sapuna. Kiselo katalizirana reakcija sinteze biodizela podnosi veći udio slobodnih masnih kiselina i vode u sirovini, ali zahtjeva višu temperaturu i dulje vrijeme trajanja reakcije što u konačnici utječe na cijenu proizvoda (Saifuddin i sur., 2009). Glavni nedostatak kemijske katalize je velika potrošnja energije zbog visoke temperature (temperatura oko 80 °C), velike količine otpadne vode koja nastaje u procesu pročišćavanja krajnjeg produkta te otežano izdvajanje katalizatora iz reakcijske smjese. Velik udio slobodnih masnih kiselina smanjuje stupanj konverzije primjenom lužine kao katalizatora jer nastaju saponificirajuće tvari koje dodatno otežavaju pročišćavanje.

2.2.2. Enzimaska sinteza biodizela

Enzimi ili biokatalizatori koji se koriste u sintezi biodizela su lipaze (EC 3.1.1.3). Istraživanjem jeftinijih puteva proizvodnje lipaza, počele su se uzgajati gljive, najčešće *Candida rugosa* (Yucel i sur., 2013), ali i *Thermomyces lanuginosus* (**Slika 5**), na čvrstim nosačima u uvjetima fermentacije pri čemu mikroorganizam kao jedan od svojih produkata metabolizma izlučuje lipazu u hranjivu podlogu.



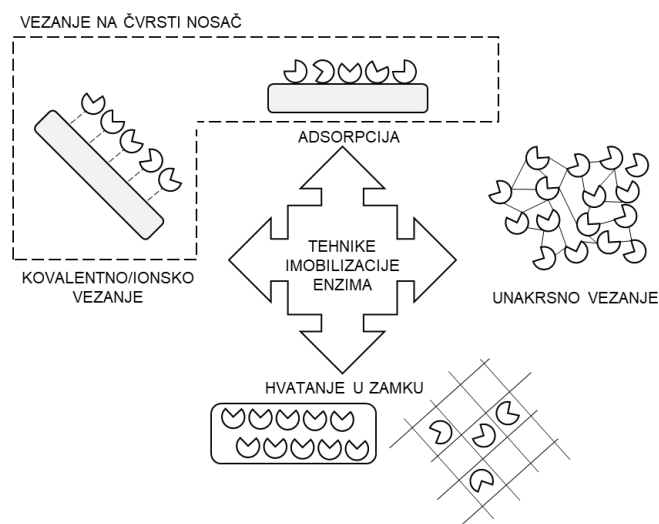
Slika 5 Kolonije *Thermomyces lanuginosus* na Sabouraud agaru (Sivagnanam i sur., 2013)

Lipaze su proteini kojima je glavna metabolička funkcija hidroliza esterskih veza u trigliceridima, a njihova primjena u industriji je široka jer osim esterifikacije kataliziraju hidrolizu, acidolizu, aminolizu i transesterifikaciju. Koriste se u prehrambenoj industriji za hidrolizu mliječne masti, u farmaceutskoj industriji za razvoj kozmetike, medicini za analitičke metode, te u sintezi biodizela.

Lipaze hidrolizom pretvaraju trigliceride u glicerol i masne kiseline, a najčešće se koriste zbog svoje selektivnosti prema supstratu. Ovi enzimi kataliziraju reakcije na granici uljne i vodene faze, odnosno aktivnost lipaze ovisi o međufaznoj površini ulja i vode. Zato što lipaze kataliziraju i hidrolizu pri čemu nastaje voda, prevelika količina vode dovest će do hidrolize produkta pa je vrlo važan optimalni udio vode, koji se mijenja ovisno o vrsti enzima i supstrata dok će nedovoljan udio vode rezultirati manjom količinom estera, odnosno inhibirat će se aktivnost enzima. Enzimska transesterifikacija provodi se sa ili bez organskog otapala. U slučaju bez organskog otapala enzim se dodaje zajedno sa puferom kako bi mu se održala odgovarajuća razina hidratiziranosti.

Općenito, lipaze su rasprostranjene zbog svoje selektivnosti/specifičnosti na temelju koje se usmjerava reakcija. Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* je protein sastavljen od 269 aminokiselina, molekulske mase 31 700 g/mol, a optimalni pH je 10-12, sferičnog je oblika s

katalitičkim mjestom sastavljenim od serina, histidina i asparaginske kiseline (Turcu, 2010). Hidroksilna grupa serina napada karboksilnu na supstratu i stvara se acil-enzimski kompleks te se oslobađa molekula alkohola, a zatim dolazi do nukleofilnog napada (OH^- grupa vode) i nastaje masna kiselina (Matte i sur, 2014). Dakle, molekula lipaze se „otvara“ supstratu kako bi se omogućilo stvaranje enzim-supstrat kompleksa. Nastankom enzim-supstrat kompleksa katalitičko područje enzima poprima komplementarnu konformaciju prema strukturi prijelaznog stanja molekule supstrata. Katalitički aktivno mjesto enzima su aminokiselinski ostatci čije reaktivne skupine okruže supstrat. Zbog međumolekulskih djelovanja enzima i supstrata dolazi do vezanja supstrata s enzimom u enzim-supstrat kompleks pri čemu dolazi do konformacijske promjene obje molekule. Lipaze u procesu proizvodnje biodizela mogu biti slobodne u reakcijskoj smjesi ili imobilizirane na nosače. Imobilizacija enzima predstavlja fizičko ili kemijsko vezanje na neku površinu pri čemu više ili manje zadržava svoju katalitičku aktivnost, a podrazumijeva ograničenje kretanja molekula enzima. Metode imobilizacije enzima obzirom na način imobilizacije dijele se na vezanje enzima na čvrsti nosač, međusobno povezivanje molekula enzima (unakrsno povezivanje enzima, tzv. *cross-linking*) i zarobljavanje enzima unutar strukture ili na površini nosača (Slika 6).



Slika 6 Vrste tehnika imobilizacije enzima (Budžaki i sur., 2019)

Vezanje enzima na čvrsti nosač ostvaruje se adsorpcijom, ionskim interakcijama ili kovalentnim vezama. Najzastupljenija je adsorpcija, zbog jednostavnosti i cijene, međutim vezani enzimi se

zbog slabijih interakcija između aminokiselinskih bočnih ogranka enzima i funkcionalnih skupina na površini nosača, mogu lako odvojiti od nosača. Odnosno, puno čvršće vezanje ostvaruje se primjenom ionske interakcije između suprotno nabijenih bočnih ogranka enzima i funkcionalnih skupina nosača. Najjača veza osigurava se kovalentnim vezanjem između enzima i nosača, a time je omogućeno i višestruko korištenje enzima, međutim, kovalentno povezivanje rezultira konformacijskim promjenama enzima, što smanjuje njegovu aktivnost (Budžaki i sur, 2019).

Unakrsno povezivanje enzima je tehnika u kojoj se enzimi međusobno povezuju uz primjenu umrežavajućih sredstava, ali oni tako umreženi imaju manju aktivnost od početne. Zarobljavanje enzima unutar strukture nosača ili na njegovu površinu osigurava zadržavanje enzimске aktivnosti, no ograničava se pristup supstrata enzimu unutar nosača (Datta i sur, 2019).

Otpad i nusproizvodi poljoprivredno-prehrambene industrije mogu se koristiti kao sirovine za proizvodnju biodizela, ali i kao nosači ili sirovina za proizvodnju nosača za imobilizaciju enzima. Neki od primjera su ljuska jajeta, aktivni ugljen proizveden od otpada prehrambene industrije, hitin, lignocelulozni otpad kao stabljika kukuruza ili banane (Budžaki i sur., 2021).

Kinetika enzimskog procesa ovisi o uporabi slobodnog ili imobiliziranog enzima, vrsti i obliku enzima, temperaturi na kojoj se odvija reakcija, omjeru alkohola i ulja (supstrata), korištenju organskih otapala u reakcijskoj smjesi, vrsti otapala i sadržaju vode u uljima kao i u reakcijskoj smjesi (Stamenković i sur., 2005).

Problem enzimske katalize je dugotrajnost procesa (24-72h) i cijena enzima zbog čega se teži razvoju sinteze sa imobiliziranim enzimima na nosačima kako bi se ostvarila veća stabilnost i višekratno korištenje tih enzima. Osim postizanja veće stabilnosti, imobilizacijom se može povećati i aktivnost enzima, smanjiti inhibicija produktima reakcije i smanjiti selektivnost prema neželjenim komponentama (Budžaki i sur., 2017). Cijena enzima čini i biodizel skupljim od onog proizvedenog kemijskom katalizom, ali i od konvencionalnog goriva. Prednost korištenja lipaza je u nižoj temperaturi na kojoj se odvija reakcija transesterifikacije u odnosu na kemijski kataliziranu reakciju (30-50 °C), neometanosti procesa zbog prisutnosti slobodnih masnih kiselina, manjim količinama otpadne vode koja se koristi za pročišćavanje mokrim postupkom, višestrukom

korištenju enzima u slučaju imobilizacije i mogućnost korištenja ulazne sirovine lošije kvalitete u odnosu na udio slobodnih masnih kiselina u polaznoj sirovini (Budžaki i sur., 2019).

2.3. SIROVINE ZA SINTEZU BIODIZELA

Trigliceridi biljnih i životinjskih masti su vrlo slični, ali se tijekom prženja njihov profil mijenja. Životinjske masti su uglavnom krute, odnosno viskozne na sobnoj temperaturi zbog većeg udjela zasićenih masnih kiselina pa nisu toliko zahvalne za rad na nižim temperaturama (Huynh, 2011). Na svjetskoj razini, dominiraju sojino, palmino i repičino ulje zbog visokog udjela ulja u sjemenki ili plodu.

Prema definiciji, otpadno ulje je: „otpadno mazivo ulje i otpadno jestivo ulje dok se otpadno jestivo ulje definira kao svako ulje koje nastaje obavljanjem ugostiteljske i turističke djelatnosti, industriji, obrtu, zdravstvenoj djelatnosti, javnoj upravi i drugim sličnim djelatnostima u kojima se priprema više od 20 obroka dnevno“ (Pravilnik o gospodarenju otpadnim uljima, NN 11/2006). Otpadno ulje se odnosi na ono korišteno pri prženju hrane ili na otpadno ulje iz procesa rafinacije tijekom proizvodnje jestivih biljnih ulja iz uljarica tzv. *soapstock*. *Soapstock* je emulzija vode, acilglicerida, fosfoglicerida i slobodnih masnih kiselina. Nakon ekstrakcije ulja iz uljarice slijedi rafinacija ulja koja se provodi fizikalnim ili kemijskim metodama, a neovisno o metodi, pri čemu se uklanjaju slobodne masne kiseline koje su nastale hidrolizom triglicerida još u sjemenu uljarica. Prema Hamm i Hamilton (2000) ulazna se sirovina mora prvo očistiti od mehaničkih nečistoća, putem filtracije, sedimentacije ili centrifugiranja i od vode, sušenjem. Kao što je prikazano na **Slici 7**, slijedi degumiranje ulja, kojim se iz ulja uklanjaju fosfolipidi, lipoproteini i proteini, a provodi se kiselinskom obradom (fosforna ili limunska kiselina), enzimskom obradom, ultrafiltracijom ili hidratacijom. Kada se ulje rafinira fizikalnim metodama, višak slobodnih masnih kiselina se uklanja destilacijom, adsorpcijom ili ekstrakcijom, dok se kemijski uklanjaju neutralizacijom. U slučaju kemijskog postupka, degumirano se ulje zagrije na 40-50 °C i miješa sa alkalnom otopinom NaOH u cilju izdvajanja slobodnih masnih kiselina kao sapuna i neutralizacije zaostale kiseline iz prethodnog koraka. Takva smjesa se izdvaja centrifugiranjem iz sirovog ulja i predstavlja 6 % ukupne ulazne sirovine.

Općenito, *soapstock* sadrži 45 % vode, 10 % masnih kiselina, 12 % diglicerida i triglicerida, 9 % zaostalih fosfolipida, pigmenta i ostalih komponenti, no taj sastav se ne može točno definirati za *soapstock* jer on ovisi o sirovini i o uvjetima prerade (Casali i sur., 2021). Kontinuirano se odvaja od sirovog ulja centrifugiranjem, a svako sljedeće odvajanje provodi se sa 10-15 % vode na temperaturi oko 85 °C kako bi se spriječilo stvaranje emulzije (Wakelyn i Wan, 2019).



Slika 7 Kemijski postupak rafinacije ulja

Zatim u procesu rafinacije slijedi bijeljenje (dekoloracija) u kojem se iz sirovog ulja uklanjaju pigmenti ulja, ali se zbog toga i smanji udio vitamina i antioksidansa, a postupak se provodi u vakuumu s dodatkom aktivne zemlje. Posljednji korak u obradi ulja je dezodoracija, odnosno destilacija vodenom parom kojom se uklanjaju svi hlapljivi sastojci koji daju nepoželjan miris ili okus.

Cijena *soapstock*-a je 10 puta manja od svježeg ulja. Nakon izlaska iz procesa rafinacije mora se stabilizirati što se u industriji postiže acidifikacijom pri čemu se kao rezultat dobiju razdvojene vodena i uljna faza ili tzv. *acid oil*. Uljna faza viskozna je i tamne boje, kao što je vidljivo na **Slici 8** (gornji sloj).



Slika 8 Acidifikacija u lijevku za odjeljivanje

Acidifikacija se provodi kako bi se oslobodile slobodne masne kiseline iz sapuna, primjenom jake mineralne kiseline (sumporna ili klorovodična). U industrijskom mjerilu, ova faza predstavlja problem u ekološkom pogledu obzirom da su otpadne vode vrlo toksične, pune kiselina. Njihovo zbrinjavanje je obavezno kako bi se spriječilo zagađenje okoliša, ali vrlo teško za ostvarivanje ekonomski isplativog procesa.

Fizikalna i kemijska svojstva *soapstock*-a najviše ovise o uljarici iz koje je proizvedena, načinu na koji je skladištena i tretirana u procesu rafinacije (Piloto-Rodriguez i sur., 2013). Uzimajući u obzir procesne i ekonomske uvjete, *soapstock*, odnosno zakiseljeno ulje koje se može koristiti u sintezi biodizela, vrlo je zahtjevna sirovina. Korištenje zakiseljenog ulja uvijek podrazumijeva hidrolizu

acilglicerida u slobodne masne kiseline, što je dodatni trošak. Većina predloženih metoda za kemijsku sintezu biodizela iz ove sirovine bila je na meti kritika, poput procesa koji su razvili Hass i sur. (2003), zbog previsoke temperature, predugog trajanja reakcije i nedovoljnog iskorištenja. Okretanje enzimskoj sintezi uvelike je smanjilo energetske troškove procesa te pružilo prihvatljiv stupanj iskorištenja, što su Watanabe i suradnici (2007) dokazali u svome radu u kojem su postigli 98 %-udjela FAME u konačnom produktu. Moguća je primjena *soapstock*-a i u dobivanju vrijednih kemikalija, poput površinski aktivnih tvari, plastifikatora ili aditiva.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je provesti enzimsku sintezu biodizela pomoću lipaze porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus* različitom kombinacijom biokemijskih reakcija koje kataliziraju lipaze: hidroliza, esterifikacija i transesterifikacija, iz otpadnog ulja u procesu rafinacije – *soapstock*-a.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sirovina

Kao sirovina za sintezu biodizela korišteno je otpadno ulje iz procesa rafinacije jestivog biljnog ulja tzv. *soapstock* prikazan na **Slici 9**. Korištena sirovina je porijeklom iz procesa rafinacije ulja tvrtke NATURE LIGHT, d.d. (Lisabon, Portugal).



Slika 9 Otpadno ulje iz procesa rafinacije jestivih biljnih ulja (*Soapstock*)

3.2.2. Katalizator

Kao katalizator korišten je enzim lipaza porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus* u tekućem stanju, Novozym 40116, proizvođača NOVOZYMES, Danska.

3.2.3. Kemikalije

Za enzimsku sintezu biodizela u okviru ovog rada korištene su sljedeće kemikalije: metanol (CH_3OH , Fischer Scientific > 99%), natrijev hidroksid (NaOH , Sigma Aldrich, 97%), klorovodična kiselina (HCl , Sigma Aldrich), fosfatni pufer ($\text{pH} = 7,4$, PBS, Sigma Aldrich), destilirana voda (laboratorijski proizvedena), kalijev hidroksid (KOH , Sigma Aldrich), *n*-heptan (C_7H_{16} , Merck), metil heptadekanoat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOCH}_3$, SigmaAldrich), trikarpin ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOCH}_2]_2\text{CHOCO}(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, Sigma Aldrich), 1,2,4-butantriol (Sigma Aldrich).

3.3. METODE

3.3.1. Sinteza biodizela

Sinteza biodizela provedena je prema dva različita reakcijska modela. Model 1 podrazumijeva kombinaciju biokemijskih reakcija: hidroliza – esterifikacija – transesterifikacija, a Model 2: esterifikacija – transesterifikacija. Prije sinteze biodizela provedena je priprema sirovine.

Priprema sirovine

Soapstock je zakiseljen sa 10 % -tnom klorovodičnom kiselinom i postavljen 7 sati na magnetnu miješalicu (prikazano na **Slici 10**) nakon čega su uljna i vodena faza odvojene centrifugiranjem na 3500 o/min tijekom 12 minuta.



Slika 10 Zakiseljeno otpadno ulje na magnetnoj miješalici

Nakon centrifugiranja, vodena i ulja faza su odvojene, vodena faza (oko 50 %) je odbačena, a preostala uljna faza isprana sa otopinom NaOH (750 ppm, 60-70 °C) i dva puta sa destiliranom vodom (60-70 °C). U kasnijim fazama pokusa se ispostavilo da je pH uljne faze prenizak zbog čega se hidroliza nije odvijala pa je ispiranje uljne faze ponovljeno. Uzorak je ispran jednom sa otopinom NaOH i četiri puta sa destiliranom vodom. Nakon odvajanja faza, iz gornje (**Slika 11**) je određen udjela slobodnih masnih kiselina volumetrijskom titracijom te glicerida na plinskom kromatografu.



Slika 11 Razdvojene faze nakon ispiranja s NaOH

Sinteza biodizela prema Modelu 1

Hidroliza

Sinteza biodizela prema Modelu 1 uključivala je hidrolizu, esterifikaciju i transesterifikaciju. Kako bi se provela hidroliza, izuzeta su dva uzorka (50 g) ispranog ulja iz prethodnog koraka, koji su dodani u Erlenmayerovu tikvicu (100 ml) zajedno sa 25 % vode i 2.5 g lipaze (5 % na masu ulja). Tikvice su postavljene u orbitalnu tresilicu na 35 °C i 250 o/min, kao na **Slici 12**. Uzorci od 1,5 mL su odvojeni nakon 60, 180, 420 minuta i 24 sata te centrifugirani 12 minuta na 3500 o/min. Nakon centrifugiranja, iz gornje su faze izuzeti uzorci za određivanje SMK, glicerida i FAME-a. Rezultati su pokazali da se reakcija ne odvija samo sa čistim enzimom pa je enzim pripremljen u fosfatnom puferu i dodan u reakcijsku smjesu. Enzim je pripremljen u puferu u omjeru 1:10. Zbog dodavanja pufera (koji sadrži vodu), smanjen je udio dodane vode u reakcijsku smjesu te ukupno iznosio 12,5 %. Nakon 24 h po završetku hidrolize, smjese iz tikvica su centrifugirane (12 min, 3500 o/min) i odvojeno je 42,35 g gornje uljne faze koja se dalje koristila za provođenje reakcije esterifikacije.



Slika 12 Sinteza biodizela prema Modelu 1

Esterifikacija

Dva uzorka ulja (41,4 g) pomiješana su sa metanolom u omjeru 1:2 i 2 % lipaze na masu ulja. Smjese su postavljene u orbitalnu tresilicu na 35 °C i 250 o/min, a uzorci su izuzimani nakon 30, 60, 180 i 420 minuta. Analiza SMK i glicerida pokazala je da se reakcija ne odvija pa je pripremljena reakcijska smjesa u koju je dodana lipaza (5 % u odnosu na masu ulja) prethodno pripremljena u fosfatnom puferu u omjeru 1:10. U reakcijsku smjesu je dodan metanol u omjeru 3:1 u odnosu na ulje. Smjese su postavljene na tresilicu pod istim uvjetima kao i prethodna reakcija esterifikacije (35 °C i 250 o/min) i uzorci su izuzimani nakon 30, 60, 80 i 420 minuta. Nakon 7 sati, provedeno je centrifugiranje (12 min, 3500 o/min) i iz gornje faze oba uzorka je izdvojeno 39,35 g uljne faze koja je dalje poslužila za provođenje reakcije transesterifikacije.

Transesterifikacija

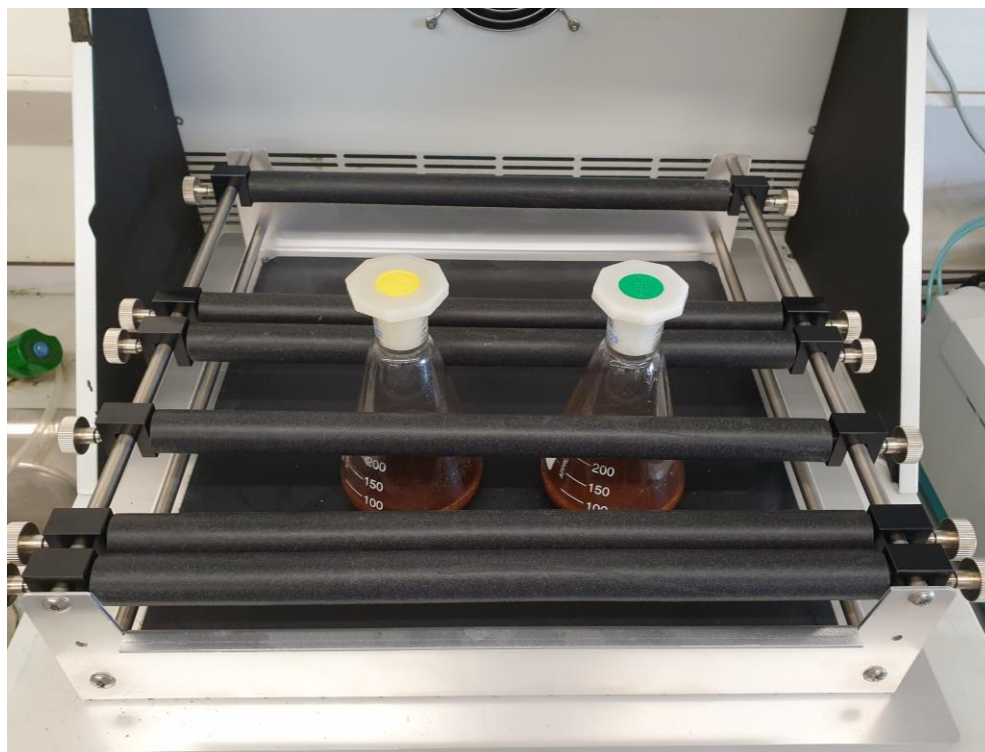
Izvagane su dvije tikvice sa 39 g uzorka, koji su zatim pomiješani sa metanolom u omjeru 1:6 i 5 % enzima na masu ulja. Metanol je dodan u suvišku kako bi se izbjegla reverzibilnost transesterifikacije. Smjese su postavljene u tresilicu na 35 °C i 250 o/min. Uzorci (2 ml) su izuzeti nakon 60, 180, 420 minuta i nakon 24 sata. Nakon 24 sata, sadržaji tikvice centrifugirani su (12 minuta, 3500 o/min) i odvojeno je 36 g uljne faze kao gornjeg sloja.

Inicijalni eksperimenti sinteze biodizela u slučaju kad je lipaza dodana u reakcijsku smjesu bez pufera nisu uspjeli, tj. nisu rezultirali zadovoljavajućim udjelom metilnih estera masnih kiselina. Obzirom na to, kod sinteze biodizela prema Modelu 1 u reakcijsku smjesu dodana je lipaza pripremljena u fosfatnom puferu, kako bi se povisio pH, i uz dodatak vode iz pufera, osigurali optimalni uvjeti za aktivnost lipaze.

*Sinteza biodizela prema Modelu 2**Esterifikacija*

Za reakciju esterifikacije 40 g obrađenog ulja (uljna faza odvojena nakon ispiranja jednom sa NaOH i 4 puta sa destiliranom vodom) je pomiješano s metanolom u omjeru 1:2 te dodano 5 % enzima na masu ulja, prethodno pripremljenog u fosfatnom puferu u omjeru 1:10. Dvije Erlenmayer

tikvice postavljene su na tresilicu (35°C, 250 o/min) i uzorci su izdvojeni nakon 30, 60, 180 i 420 minuta te centrifugirani (12 min, 3500 o/min), a iz uljne su faze analizirane SMK, gliceridi i metil esteri masnih kiselina.



Slika 13 Sinteza biodizela prema Modelu 2

Transesterifikacija

Dva uzorka iz prethodnog koraka pomiješana su sa metanolom u omjeru 1:3, zajedno sa 5 % enzima na masu ulja, pripremljenog u fosfatnom puferu. Uzorci su postavljeni na tresilicu (35 °C, 250 o/min) kao što je prikazano na slici 13 pri čemu su uzorci za daljnje analize izuzimani nakon 60, 180, 420 minuta i 24 sata. Nakon centrifugiranja, uzorci su podijeljeni na gornju uljnu fazu (FAME) i donju u kojoj su prisutni glicerol, neizreagirani metanol, lipaza u puferu i voda. Gornja uljna faza, biodizel, je odvojena za određivanje SMK, glicerida i metilnih estera masnih kiselina.

3.3.2. Određivanje slobodnih masnih kiselina

Udio slobodnih masnih kiselina izražava se kao kiselinski broj, kiselinski stupanj ili kao postotak oleinske kiseline. Određivanje je provedeno prema normi EN 14104:2003, u tri paralele, volumetrijskom titracijom sa kalijevim hidroksidom (KOH) do promjene boje.

U tri Erlenmeyerove tikvice odvagano je 0,5 g ulja te je dodano 30 mL neutralne smjese etera i etanola (1:1), te uz 4-5 kapi fenolftaleina kao indikatora (10 g/L u 95% etanolu) reakcijska smjese titrirana je sa 0,1 mol/L KOH do promjene boje iz žuto-narančaste u ružičastu koja traje barem 15 sekundi. Udio SMK izražen je kao % oleinske kiseline, a izračunat prema jednadžbi (1).

$$\% SMK = \frac{V(KOH) \cdot c(KOH) \cdot 282 \text{ g/mol}}{10 \cdot m(\text{ulja})} \quad (1)$$

gdje je: m - odvagana količina uzorka (g)

$V(KOH)$ - volumen KOH ($c=0,1$ mol/L) utrošen za titraciju (mL)

282 g/mol - molna masa oleinske kiseline

3.3.3. Određivanje mono-, di- i triglicerida

Određivanje mono-, di- i triglicerida provedeno je na plinskom kromatografu Dani Master GC s plameno ionizacijskim detektorom (FID) na koloni DN-WAX karakteristika: $L = 10$ m, $I.D. = 0,32$ mm i $d = 0,1$ μ m uz helij kao plin nosioc $p = 80$ kPa te heptan kao otapalo.

Za interni standard korišten su trikarpin i 1,2,4-butantriol. Metoda se sastojala od održavanja temperature na 50°C tijekom jedne minute i zatim zagrijavanja do 180°C brzinom od 15°C/min. Nadalje temperatura od 230°C postignuta je zagrijavanjem brzinom od 7 °C/min nakon čega je uz brzinu zagrijavanja od 10 °C/min postignuta temperatura od 370°C brzinom 10 °C/min koja je zadržana 5 minuta. Kao interni standard korišteni su 1,2,4-butantriol (80 μ L) i trikarpin (100 μ L).

3.3.4. Određivanje metilnih estera masnih kiselina

Određivanje metilnih estera masnih kiselina provedeno je prema normi EN14103 na plinskom kromatografu Dani Master GC s plameno ionizacijskim detektorom (FID) na koloni DN-WAX karakteristika: $L = 30 \text{ m}$, $I.D. = 0,25 \text{ mm}$, $d = 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ uz helij kao plin nosioc $p = 80 \text{ kPa}$ i heptan kao otapalo. Za interni standard korišten je metil heptadekanoat. Početna temperatura je bila $120 \text{ }^\circ\text{C}$ uz temperaturni gradijent od $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po minuti sve do $220 \text{ }^\circ\text{C}$ koja se održavala 10 minuta. Metodom je provedena identifikacija metilnih estera masnih kiselina između C_{14} do C_{24} .

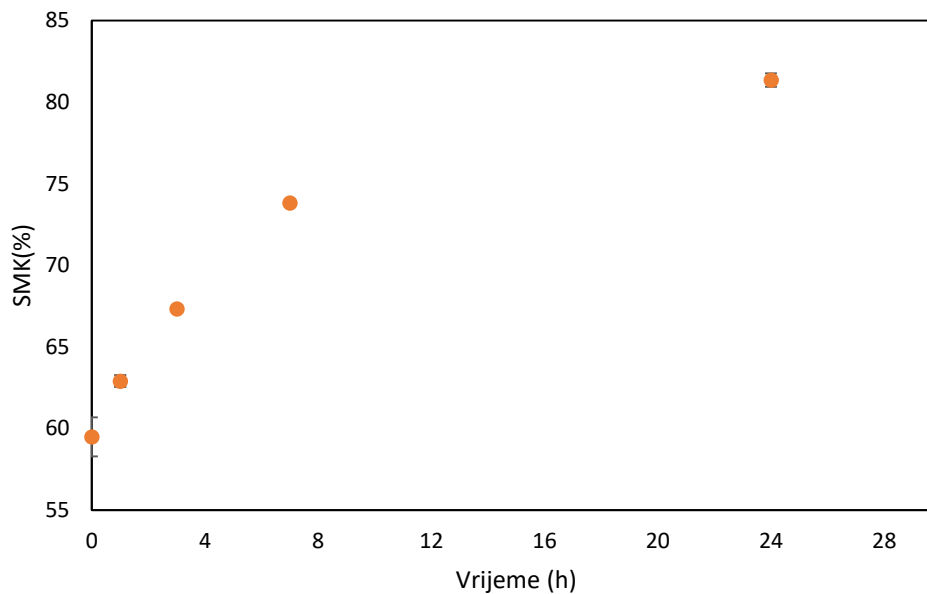
4. REZULTATI I RASPRAVA

Ovim se diplomskim radom htjela provesti enzimsku sintezu biodizela pomoću lipaze porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus* različitom kombinacijom biokemijskih reakcija koje kataliziraju lipaze: hidroliza, esterifikacija i transesterifikacija, iz otpadnog ulja procesa rafinacije iz proizvodnje jestivog biljnog ulja – *soapstock*-a. U tu svrhu provedene su dvije sinteze s dvije različite kombinacije biokemijskih reakcija koje katalizira lipaza, prema Modelu 1 i Modelu 2. Model 1 obuhvaćao je niz reakcija od kojih je prva hidroliza, zatim esterifikacija i transesterifikacija, a Model 2 esterifikaciju i transesterifikaciju. Prije same sinteze provedena je priprema sirovine koja je uključivala zakiseljavanje *soapstock*-a s 10 %-tnom klorovodičnom kiselinom. Pored navedenog, reakcije prema Modelu 1 su prvo provedene s čistom lipazom iz *T. lanuginosus*, a nakon toga s lipazom pripremljenom u fosfatnom puferu. U sintetiziranom biodizelu određen je udio metilnih estera masnih kiselina na temelju čega je napravljena procjena prikladnosti *soapstock*-a kao sirovine za proizvodnju biodizela uz optimalnu kombinaciju biokemijskih reakcija. Prethodno provedene su i analize sirovine, i to udio slobodnih masnih kiselina i udio mono-, di- i triglicerida.

Sukladno navedenom rezultati su podijeljeni u tri skupine. Sva eksperimentalna određivanja provedena su u dvije paralele, a rezultati su prikazani u tablicama i dijagramima te uspoređeni s rezultatima objavljenim u znanstvenim radovima.

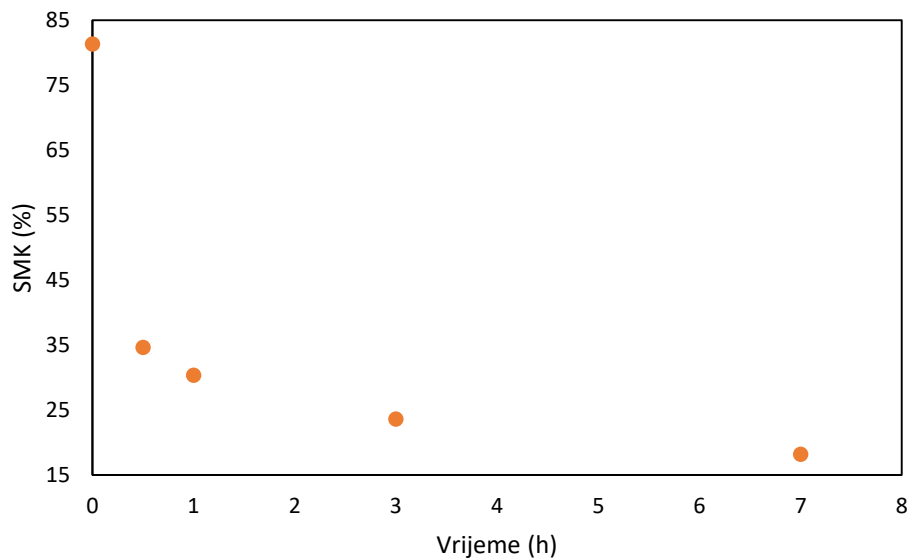
4.1. Udio slobodnih masnih kiselina

Slobodne masne kiseline određene su volumetrijski titracijom prema normi NP EN 14104:2003 i rezultati su izraženi kao ekvivalent oleinske kiseline. Nakon zakiseljavanja ulja određen je udio SMK i iznosio je 59,49 %. Na **Slikama 14 - 18** prikazana je promjena udjela SMK tijekom hidrolize, esterifikacije i transesterifikacije koje su provedene u okviru slijeda reakcija prema Modelu 1 i Modelu 2.



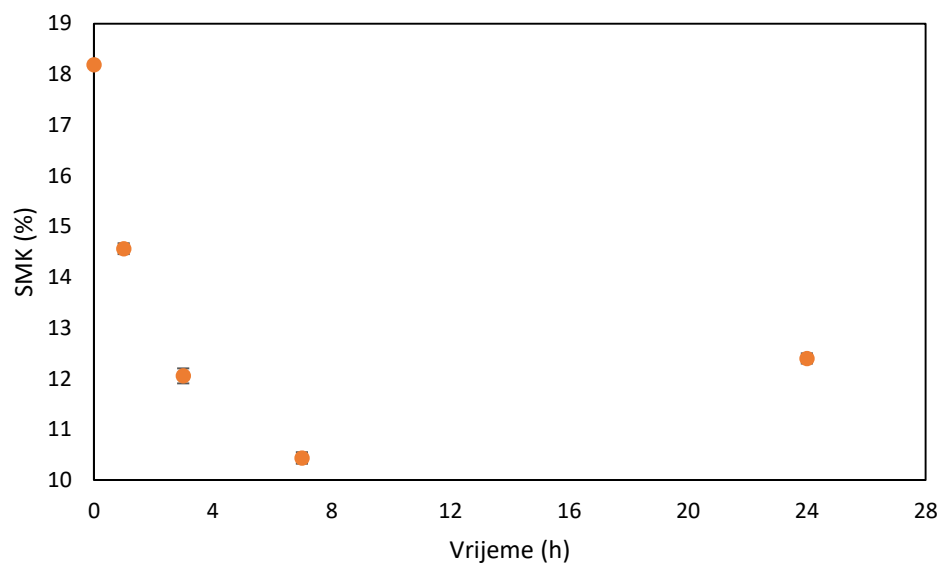
Slika 14 Udio slobodnih masnih kiselina tijekom hidrolize (Model 2)

Bueso i suradnici (2015) proveli su istraživanje na ulju iz biljke *Jatropha curcas L.*, a koja je autohtona biljka na području središnje Amerike i predstavlja potencijalnu sirovinu za proizvodnju biodizela s obzirom na visok udio ulja i moguć na rast na siromašnom tlu. U eksperimentu koristeći lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* i *Candida antartica* pokazano je da je poželjno prije esterifikacije provesti hidrolizu ulja kako bi se oslobodile masne kiseline. Također, Talukder i suradnici (2010) su uspješno proveli konverziju otpadnog prženog ulja u slobodne masne kiseline nakon samo 10 h u postupku hidrolize. Udio slobodnih masnih kiselina nakon enzimske hidrolize uz pomoć lipaze iz *T. lanuginosus* u okviru ovog diplomskog rada također je u porastu te je svoj maksimum postigao nakon 24 sati. (**Slika 14**).



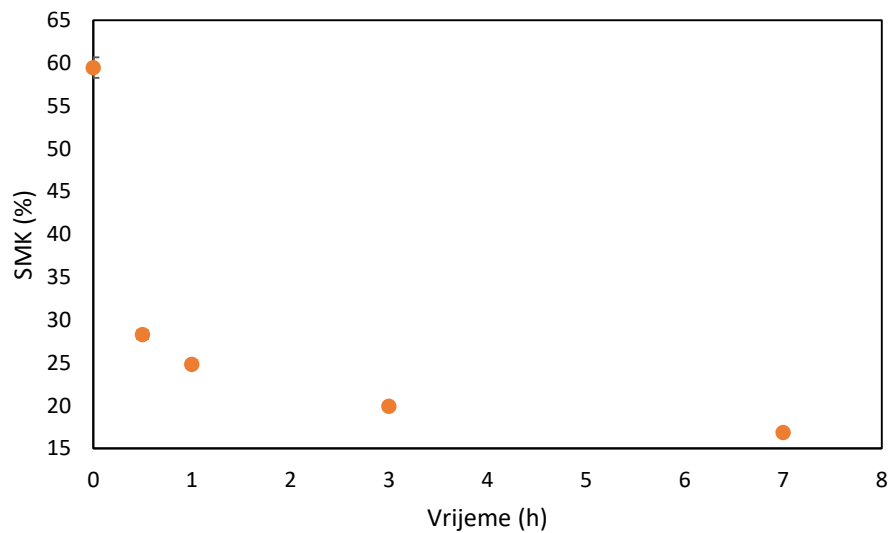
Slika 15 Udio slobodnih masnih kiselina tijekom esterifikacije (Model 1)

Prema Sendzikiene i suradnicima (2004) u prvih 15 minuta najviše SMK se konvertira u FAME, odnosno brzina reakcija se mijenja u ovisnosti sa vremenom, kao što je vidljivo i na **Slici 15**. Udio slobodnih masnih kiselina kontinuirano pada u ovisnosti o vremenu. U prvih pola sata je zabilježen najveći pad udjela SMK, odnosno najviše karboksilnih kiselina je reagiralo sa alkoholom dajući estere masnih kiselina.

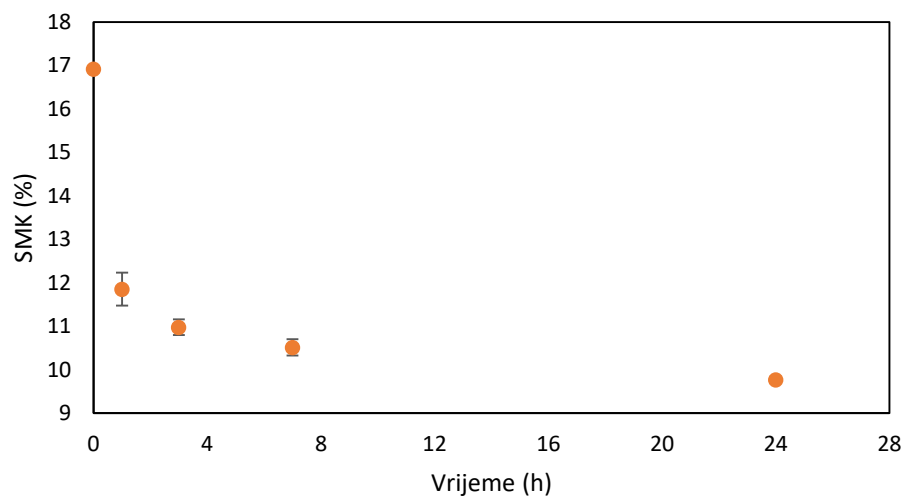


Slika 16 Udio slobodnih masnih kiselina tijekom transesterifikacije (Model 1)

Na **Slici 16** prikazan je udio slobodnih masnih kiselina u ovisnosti o vremenu tijekom transesterifikacije kao zadnje reakcije u okviru reakcija provedenih prema Modelu 1 iz kojeg je vidljivo da je pad udjela SMK manji u odnosu na pad udjela SMK tijekom reakcije esterifikacije koja je prethodila. Najveći pad udjela SMK tijekom transesterifikacije je zabilježen u prvih 4 sata provođenja reakcije. Isto tako, iz dijagrama (**Slika 16**) vidljiv je porast SMK iz čega se može zaključiti da produljenje vremena reakcije uzrokuje reverzibilnu reakciju transesterifikacije. Od metilnih estera masnih kiselina nastaju slobodne masne kiseline uz oslobađanje metanola što potvrđuju objavljeni rezultati istraživanja Wancura i suradnika (2020).



Slika 17 Udio slobodnih masnih kiselina tijekom esterifikacije (Model 2)



Slika 18 Udio slobodnih masnih kiselina tijekom transesterifikacije (Model 2)

Slike 17 i 18 prikazuju sintezu biodizela bez provedene hidrolize, odnosno enzimsku sintezu prema Modelu 2, slijed dvije reakcije: esterifikacije i transesterifikacije. Udio slobodnih masnih kiselina u reakcijama esterifikacije i transesterifikacije koje su provedene u okviru slijednih reakcija po Modelu 2, imaju isti trend kao i spomenute reakcije koje su provedene nakon hidrolize u okviru slijednih reakcija po Modelu 1, odnosno najveći pad udjela SMK zabilježen je tijekom reakcije esterifikacije u prvih sat vremena dok je pad udjela SMK kod reakcije transesterifikacije puno manji. Nakon 24 sata provođenja transesterifikacije u okviru slijednih reakcija prema Modelu 2 nije zabilježena reverzibilna reakcija transesterifikacije, za razliku od slijednih reakcija provedenih prema Modelu 1.

4.2. Udio mono-, di- i triglicerida

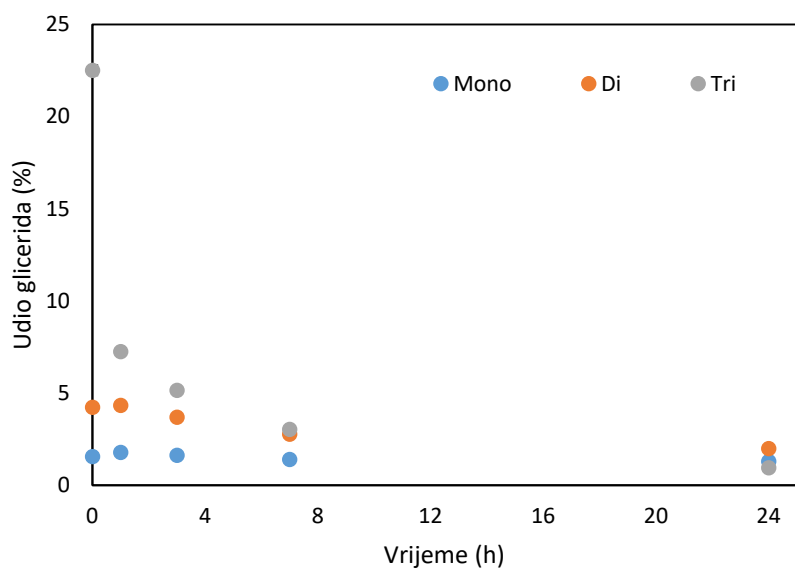
Udio mono-, di- i triglicerida u sirovini određen je na plinskom kromatografu Dani Master GC prema normi NP EN 14105 i njihov udio je prikazan u **Tablici 1**.

Tablica 1 Udio glicerida u sirovini za sintezu biodizela *soapstock*-u

Gliceridi	Udio (%)
Monogliceridi	1,19
Digliceridi	2,19
Trigliceridi	20,83

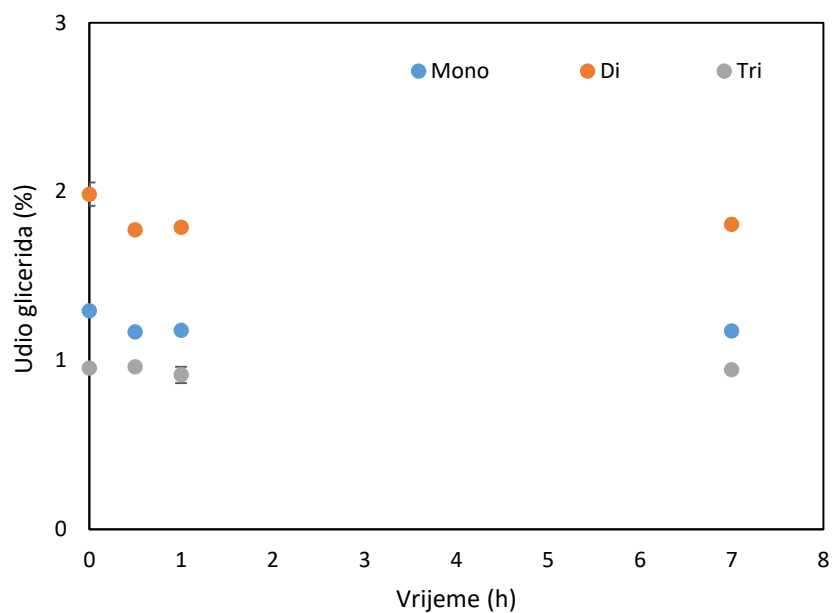
Soapstock uglavnom sadrži iste komponente u određenom postotku bez obzira od koje sirovine potječe, pa je tako prema Bart i suradnicima (2010b) određen prosječni udio koji uključuje 10,1 % triglicerida, 1,8 % diglicerida i 2 % monoglicerida. Uspoređujući podatke iz literature i **Tablice 1** može se zaključiti da se udio triglicerida razlikuje.

Udio mono-, di- i triglicerida u sirovom biodizelu u pojedinim fazama sinteze, prema Modelu 1 i Modelu 2, prikazan je na **Slikama 19 - 22**.

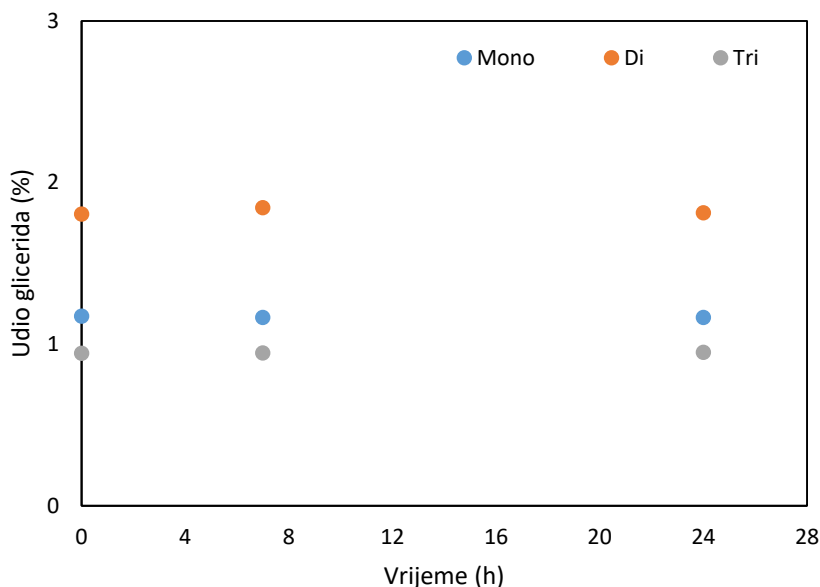


Slika 19 Udio glicerida tijekom hidrolize

Sukladno **Slici 14** gdje je vidljiv porast slobodnih masnih kiselina, na **Slici 19** vidljiv je pad udjela glicerida pri čemu je najveći pad zabilježen u prvih sat vremena, što je bilo i za očekivati.

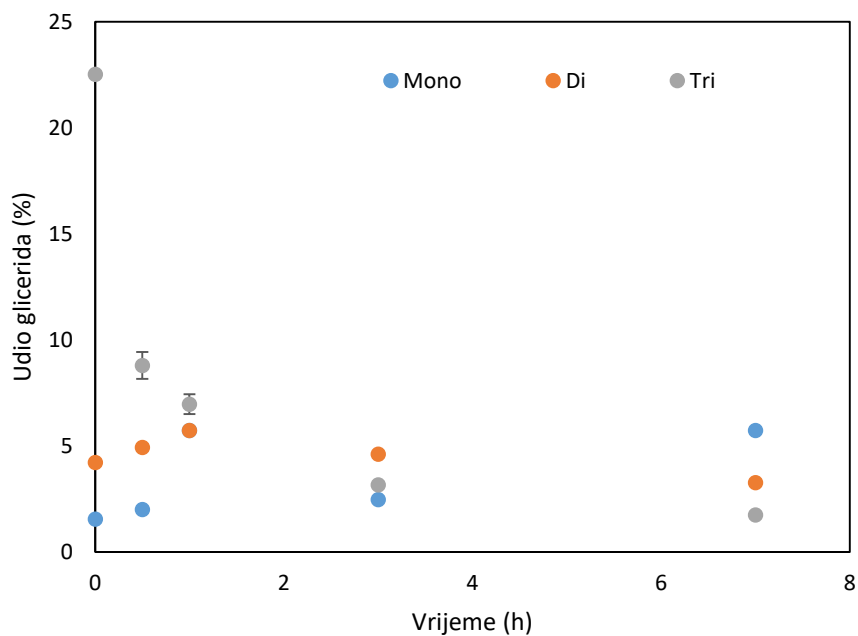


Slika 20 Udio glicerida tijekom esterifikacije (Model 1)



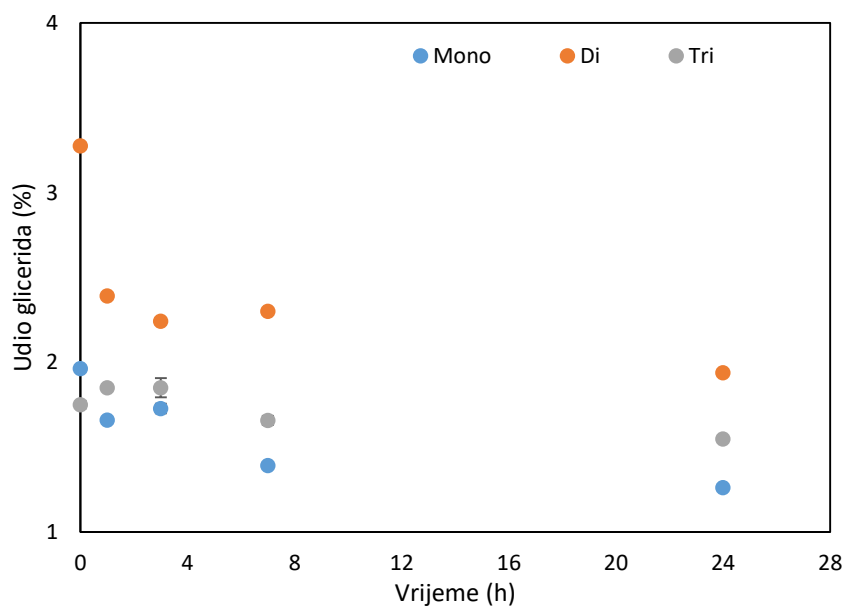
Slika 21 Udio glicerida tijekom transesterifikacije (Model 1)

Slika 20 i 21 prikazuju konstantne vrijednosti glicerida (mono-, di- i triglicerida), što i odgovara reakciji esterifikacije i transesterifikacije nakon hidrolize. Odnosno, potvrđuje da su se u toj fazi formirali esteri iz masnih kiselina i alkohola, čiji je pad vidljiv na **Slikama 15 i 16**, a što su i Pinzi i suradnici (2011) prikazali u svom radu. Također, autori su potvrdili da sastav masnih kiselina (stupanj zasićenosti i duljina lanca) utječe na brzinu konverzije, odnosno na bolju iskorištenost procesa sinteze biodizela.



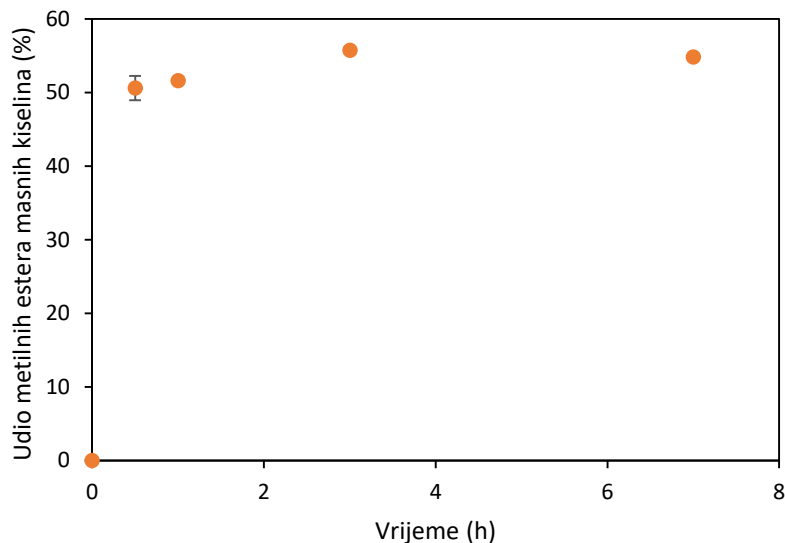
Slika 22 Udio glicerida tijekom esterifikacije (Model 2)

Trigliceridi tijekom esterifikacije bez prethodne hidrolize (Model 2) naglo opadaju, nakon čega se uspostavlja konstantna vrijednost tek tijekom transesterifikacije što je za očekivati, a što je prikazano na **Slikama 22 i 23**.



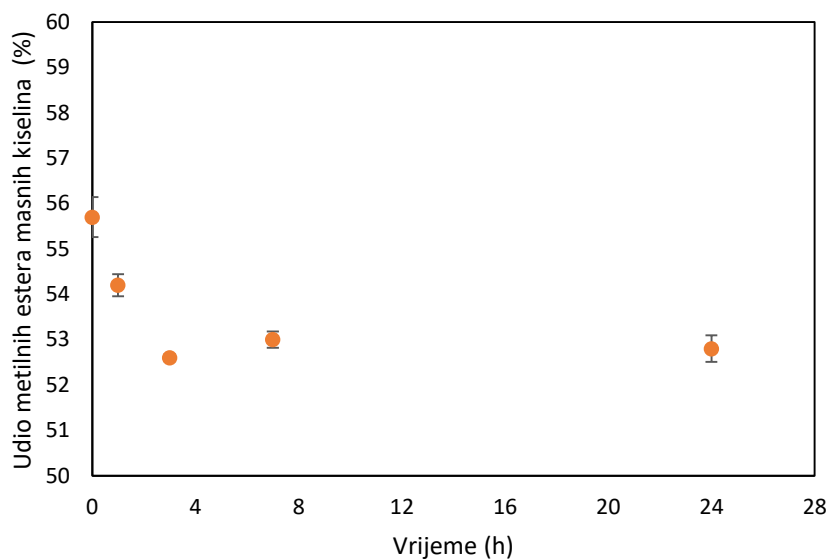
Slika 23 Udio glicerida tijekom transesterifikacije (Model 2)

4.3. Udio metilnih estera masnih kiselina



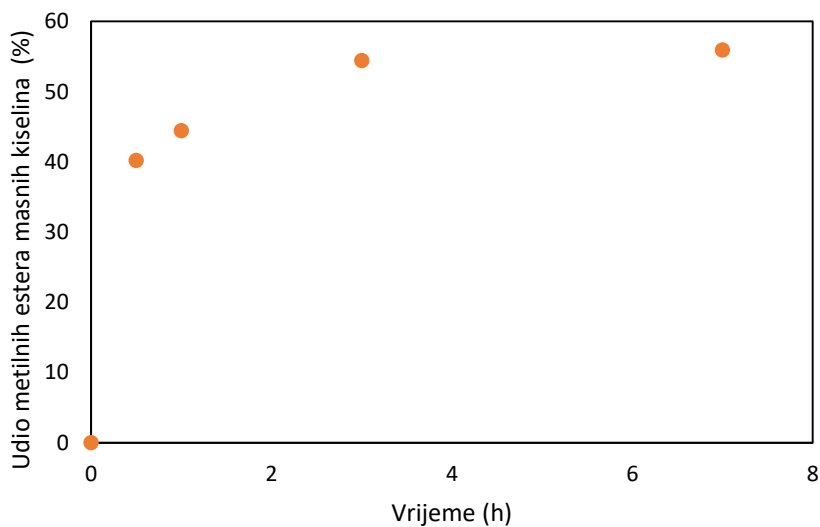
Slika 24 Udio FAME tijekom esterifikacije (Model 1)

Slika 24 prikazuje udio metilnih estera masnih kiselina tijekom esterifikacije koja je uslijedila nakon hidrolize tijekom provođenja pokusa prema Modelu 1, iz koje je vidljiv njihov nagli porast u prvih pola sata, što odgovara naglom padu slobodnih masnih kiselina prikazanom na **Slici 15**. Udio FAME-a u reakcijskoj smjesi tijekom transesterifikacije se nije povećala, nego je došlo do reverzibilne reakcije te se udio FAME smanjio za 2 % (**Slika 25**). Cruz i suradnici (2018) su nakon provedene esterifikacije i prethodne hidrolize na *soapstock*-u, uspjeli dobiti udio metilnih estera od 84 %. U okviru ovog diplomskog rada udio metilnih estera masnih kiselina u reakcijskoj smjesi iznosio je 54,8 %.

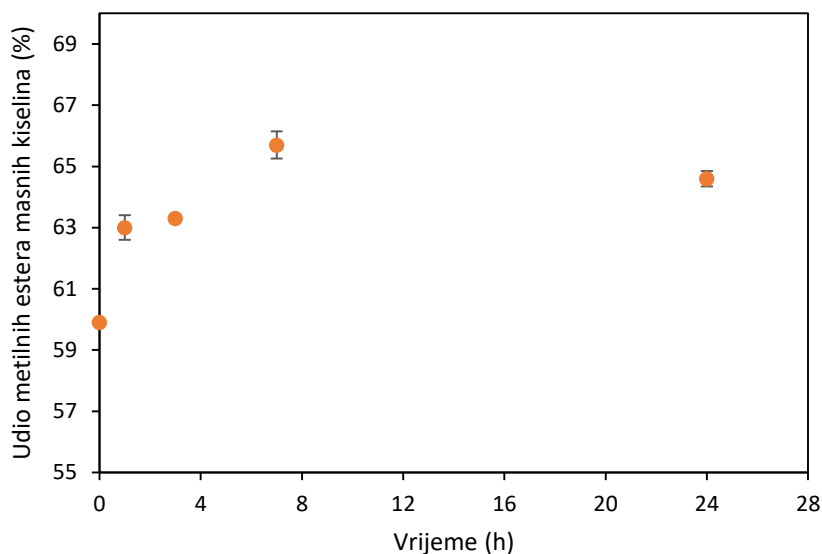


Slika 25 Udio FAME tijekom transesterifikacije (Model 1)

Slika 25 prikazuje udio metilnih estera masnih kiselina tijekom reakcije transesterifikacije koja je provedena nakon hidrolize i esterifikacije prema Modelu 1. Vidljiv je pad FAME u prva četiri sata reakcije, što ukazuje na reverzibilnost reakcije.



Slika 26 Udio FAME tijekom esterifikacije (Model 2)



Slika 27 Udio FAME tijekom transesterifikacije (Model 2)

Rezultati prikazani na **Slikama 26 i 27**, udio metilnih estera masnih kiselina tijekom esterifikacije i transesterifikacije, slijednih reakcija provedenih prema Modelu 2, u korelaciji su s rezultatima prikazanim na **Slikama 17 i 18**. Vrijednosti za udio FAME rastu sukladno padu udjela SMK na spomenutim slikama. Kombiniranom esterifikacijom i transesterifikacijom bez prethodne hidrolize očekivao se manji udio FAME, no rezultati istraživanja su pokazali da se upravo Modelom 2 postigla veća količina. Konačni rezultati udjela metilnih estera masnih kiselina nakon transesterifikacije kao zadnje reakcije u nizu reakcija prema Modelu 1 i Modelu 2 iznose, za reakciju transesterifikacije prema Modelu 1 52,8 % dok za reakciju transesterifikacije prema Modelu 2 64,6 %. U literaturi su zabilježene nešto veće vrijednosti, pa je prema Cavalcanti-Oliviera i suradnicima (2011) u slijednim reakcijama bez hidrolize postignuto u konačnici 92 % metilnih estera masnih kiselina.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju svih rezultata postignutih u okviru ovog diplomskog rada mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Korištenje *soapstock*-a u sintezi biodizela zahtjeva predobradu. Potrebno je prethodno zakiseljavanje kako bi se razdvojile uljna i vodena faza.
- Bez dodatka pufera, reakcija se odvijala izrazito malom brzinom jer je pH reakcijske smjese bio prenizak i nedovoljna količina vode je bila prisutna za normalnu aktivnost lipaze. Obzirom da lipaza katalizira reakcije na granici faza, nakon dodatka pufera, reakcija se odvijala normalnom brzinom.
- Konačni rezultati udjela metilnih estera masnih kiselina nakon transesterifikacije kao zadnje reakcije u nizu reakcija prema Modelu 1 i Modelu 2 iznose, za reakciju transesterifikacije prema Modelu 1 52,8 % dok za reakciju transesterifikacije prema Modelu 2 64,6 %. Dakle, kombinacija reakcija prema Modelu 2 daje bolje rezultate.
- Sirovi biodizel dobiven ovim reakcijama, Modelom 1 i Modelom 2, ne odgovara zahtjevima norme EN14214 , odnosno ne ispunjava kriterij od minimalno 96,5 % udjela metilnih estera masnih kiselina u sirovom biodizelu.

6. LITERATURA

- Atadashi M: Purification of crude biodiesel using dry washing and membrane technologies. *Alexandria Engineering Journal* 54:1265-1272, 2015.
- Bart J, Palmeri N, Cavallaro S: Feedstocks for biodiesel production. *Biodiesel Science and Technology* 130-225, 2010.
- Budžaki S, Miljić G: Otpadno ulje i nusproizvodi prehrambene industrije kao sirovine za proizvodnju biodizela, Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije, str. 165-171, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.
- Budžaki S, Miljić G, Tišma M, Sundaram S, Hessel V: Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors?. *Applied Energy* 201:124-134, 2017.
- Budžaki S, Ostojčić M, Strelec I: Heterogeni biokatalizatori na bazi otpada/nusproizvoda prehrambene industrije za održivu proizvodnju biodizela, Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije – Knjiga 2, str. 241-258, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2019.
- Bueso F, Moreno L, Cedeno M, Manzarek K: Lipase-catalyzed biodiesel production and quality with *Jatropha curcas* oil: exploring its potential for Central America. *Journal of Biological Engineering* 9:12, 2015.
- Casali B, Brenna E, Parmeggiani, Tessaro D, Tentori D: Enzymatic Methods for the Manipulation and Valorization of Soapstock from Vegetable Oil Refining Processes. *Sustainable Chemistry*, 2:74-91, 2021.
- Cavalcanti-Oliveira E, Silva PR, Ramos AP, Aranda DAG, Freire DMG: Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* - Lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. *Enzyme Research* 1–8, 2011.
- Cruz M, Costa E, Fonseca Almeida M, Alvim-Ferraz M, Maia Dias J: Recovery of by-products from the olive oil production and the vegetable oil refining for biodiesel production, *Detritus*, 8:63-69, 2018.

- Dahman Y, Syed K, Begum S, Roy P, Mohtasebi B: Biofuels: Their characteristics and analysis. *Biomass, Biopolymer-Based Materials and Bioenergy* 14:277-325, 2019.
- Datta S, Christena LR, Rajaram YRS: Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3(1):1-9, 2013.
- Hamm W, Hamilton RJ: Edible Oil Processing, CRC Press, Sheffield, 2000.
- Huynh L, Kasim NS, Ju Y: Biodiesel Production from Waste Oils. *Biofuels* 16:375-396, 2011.
- Kondić V, Višnjić V, Pisačić K, Bojanić B: Prednosti, nedostaci i ekološki učinci biodizelskog goriva. *Tehnički glasnik* 9:260-263, 2015.
- Knothe G, Gerpen JV, Krahl J: Fuel properties. U *The Biodiesel Handbook*, str. 64, AOCS Press, 2005.
- Matte CR, Bussamar R, Dupont J, Rodrigues RC; Hertz FP, Ayub AZ: Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by different techniques on Immobcad 150 Support: Characterization and Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172:2507-2520, 2014.
- Noureddini H, Zhu D: Kinetics of transesterification of soybean oil, *Journal of American Oil Chemists Society*, 74, 1457–1463, 1997.
- Parente E: Processo de Produção de Combustíveis a partir de Frutos ou Sementes Oleaginosas, PI – 8007957, 1983.
- Pinnarat T, Savage PE: Assessment of Noncatalytic Biodiesel Synthesis Using Supercritical Reaction Conditions. *Industrial and Engineering Chemical Research* 47:6801-6808, 2008.
- Pinzi S, Gandía LM, Arzamendi G, Ruiz JJ, Dorado MP: Influence of vegetable oils fatty acid composition on reaction temperature and glycerides conversion to biodiesel during transesterification. *Bioresource Technology* 102(2):1044–1050, 2011.

- Piloto-Rodriguez R, Melo EA, Goyos-Perez L, Verhelst S: Conversion of by-products from the vegetable oil industry into biodiesel and its use in internal combustion engines: A review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 31:287-301, 2013.
- Saifuddin NM, Raziah AZ, Nor Farah H: Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Cooking Oil Using an Optimized Lipase Enzyme/Acid-Catalyzed Hybrid Process. *E-Journal of Chemistry* 6:485-495, 2009.
- Sendzikiene E, Makareviciene V, Janulis P, Kitrys S: Kinetics of free fatty acids esterification with methanol in the production of biodiesel fuel. *European journal of lipid science and technology* 106(12): 831–836, 2004.
- Sinčić D: Biodizel: Svojstva i tehnologija proizvodnje, Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2008.
- Sinčić D: Kemijsko-inžnjerski aspekti proizvodnje biodizela I – Biogoriva, svojstva biodizela i osnove proizvodne tehnologije. *Kemija u industriji : časopis kemičara i tehnologa Hrvatske* 63:19-31, 2014.
- Sivagnanam S, Chen S, Halliday C, Packham D: *Thermomyces lanuginosus* infective endocarditis: Case report and areview of endocarditis due to uncommon moulds. *Medical Micology Case Reports* , 2:152-155, 2013.
- Stamenković OS, Lazid ML, Veljkovid VB, Skala DU: Dobijanje biodizela tranesterifikacijom katalizovanom enzimima. *Hemijska industrija*, 59: 49-59, 2005.
- Stojanović M: Uporaba biodizela kao pogonskog goriva u cestovnom prometu. *U Pomorski zbornik* 47: 133-143, Pomorski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, 2013.
- Talukder MR, Wu JC, Chua LP: Conversion of Waste Cooking Oil to Biodiesel via Enzymatic Hydrolysis Followed by Chemical Esterification. *Energy Fuels*, 24:2016-2019, 2010.
- Turcu MC: Lipase-catalyzed approaches towards secondary alcohols: Intermediates for Enantio purgedrugs. *Turun Yliopisto, University of Turku*, 2010.

- Udovičić B: Nužnost razvitka i neodrživost „Održivog razvoja“. U Neodrživost održivog razvoja - Energetski sustavi u globalizaciji i slobodnom tržištu, str. 71-85. Kigen d.o.o., Zagreb, 2004.
- Vlada Republike Hrvatske: *Uredba o kakvoći biogoriva*. Narodne novine 141/05, 2005.
- Wakelyn PJ i Waan P: Food industry-solvents for extraction. U Handbook of Solvents, str. 981-982 ChemTec Publishing: Toronto, 2019.
- Wancura JHC, Fantinel AL, Ugalde GA, Donato FF, Vladimir de Oliveira J, Tres MV, Jahn SL: Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations. *Journal of Cleaner Production*, 2020.
- Watanabe Y, Pinsirodom P, Nagao T, Yamauchi A, Kobayashi T, Nishida Y, Takagi Y, Shimada Y: Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44:99-105, 2007.
- Yucel S, Terzioglu P, Ozcimen D: Lipase applications in biodiesel production. U Biodiesel - feedstocks, production and applications. str. 209-251, InTech, 2013.